

This Page Is Inserted by IFW Operations
and is not a part of the Official Record

BEST AVAILABLE IMAGES

Defective images within this document are accurate representations of the original documents submitted by the applicant.

Defects in the images may include (but are not limited to):

- BLACK BORDERS
- TEXT CUT OFF AT TOP, BOTTOM OR SIDES
- FADED TEXT
- ILLEGIBLE TEXT
- SKEWED/SLANTED IMAGES
- COLORED PHOTOS
- BLACK OR VERY BLACK AND WHITE DARK PHOTOS
- GRAY SCALE DOCUMENTS

IMAGES ARE BEST AVAILABLE COPY.

**As rescanning documents *will not* correct images,
please do not report the images to the
Image Problem Mailbox.**

THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19)



JAPANESE PATENT OFFICE

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11) Publication number: **08240591 A**(43) Date of publication of application: **17 . 09 . 96**

(51) Int. Cl.

G01N 33/543
G01N 30/90
(21) Application number: **08013273**(22) Date of filing: **29 . 01 . 96**(30) Priority: **30 . 01 . 95 US 95 380119**(71) Applicant: **BAYER CORP**(72) Inventor: **SOMMER RONALD G**

(54) **DETERMINATION METHOD FOR SUBSTANCE TO
BE INSPECTED ON TEST PIECE FOR
IMMUNOCHROMATOGRAPHY**

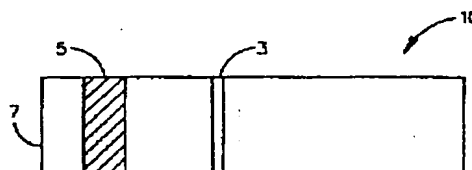
sideways under the read head of a detector.

COPYRIGHT: (C)1996,JPO

(57) Abstract:

PROBLEM TO BE SOLVED: To allow a determination of a substance to be inspected by using a test piece for immunochromatography and measuring a signal from a label at a detection area.

SOLUTION: A fluid sample is brought into contact with an immunochromatography matrix containing an object to be labeled and connected for a substance to be inspected. In this case, a test piece 10 with, for example, a blocking band 3, antihuman serum albumin (HSA), a region 5 containing gold sol, and a test application area 7, is used. The test piece 10 carries a detectable label and forms a connection body of the subject to be inspected and the object to be labeled and connected by reacting with the substance to be inspected while a fluid sample flows along the matrix due to capillarity. Then, the reflection factor of a label included in the connection body is measured and HSA within the fluid sample is determined in at least one region by a reflection spectral photometer with a sample table for moving



THIS PAGE BLANK (USPTO)

(19) 日本国特許庁 (J P)

(12) 公開特許公報 (A)

(11) 特許出願公開番号

特開平8-240591

(43) 公開日 平成8年(1996)9月17日

(51) IntCl. ⁶	識別記号	庁内整理番号	F I	技術表示箇所
G 0 1 N 33/543 30/90	5 2 1		G 0 1 N 33/543 30/90	5 2 1

審査請求 未請求 請求項の数17 O L (全 9 頁)

(21) 出願番号 特願平8-13273

(22) 出願日 平成8年(1996)1月29日

(31) 優先権主張番号 08/380119

(32) 優先日 1995年1月30日

(33) 優先権主張国 米国 (U S)

(71) 出願人 391007079

バイエルコーポレーション

アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、

エルクハート、マイルス・アベニュー

1884

(72) 発明者 ロナルド・ジー・ソマー

アメリカ合衆国、インディアナ州、46514、

エルクハート、マール 55745

(74) 代理人 弁理士 津国 肇 (外1名)

(54) 【発明の名称】 免疫クロマトグラフィー用試験片上での被検物質の定量法

(57) 【要約】

【課題】 免疫クロマトグラフィー用試験片フォーマットの使用によって、試料中の被検物質を定量する手段の提供

【解決手段】 流体試料を免疫クロマトグラフィーマトリックスに接触させ、それにより、流体試料が毛管現象によってマトリックスに沿って流れる工程を含み、該マトリックスが、被検物質に対する標識化結合相手を含有し、かつ標識化結合相手に含まれる標識の検出によって被検物質が測定される少なくとも1の検出区域を有する、流体試料中の被検物質の測定方法において、該検出区域における標識からの信号を測定することができる検出器を有する計器を用いてその信号を測定する工程を含むことを特徴とする方法。

【特許請求の範囲】

【請求項1】 流体試料を免疫クロマトグラフィーマトリックスに接触させ、それにより、流体試料が毛管現象によってマトリックスに沿って流れる工程を含み、該マトリックスが、被検物質に対する標識化結合相手を含有し、かつ標識化結合相手に含まれる標識の検出によって被検物質が測定される少なくとも1の検出区域を有する、流体試料中被検物質の測定方法において、該検出区域における標識からの信号を測定することができる検出器を有する計器を用いてその信号を測定する工程を含むことを特徴とする方法。

【請求項2】 流体試料における1種以上の被検物質の濃度を測定する方法において、

a) そこを通して流体試料が毛管現象によって流れることができるマトリックスを含む試験片であって、検出可能な標識を担持し、被検物質と反応して被検物質-標識化結合相手結合体を形成することができる、被検物質に対する可動性の特異的結合相手を含有する第一の領域と、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する少なくとも1の第二の領域とを有する試験片を用意する工程、

b) 被検物質を含有する疑いのある流体試料を試験片につけることにより、被検物質を該被検物質に対する可動性の標識化特異的結合相手と接触させ、それにより、流体試料中に存在する被検物質が、更に反応することが自由である未反応の過剰の標識化結合相手を残しながら、標識化特異的結合相手と結合して、結合体を形成するようにし、それにより、流体試料が、被検物質/標識化結合相手結合体および未反応の標識化結合相手を、毛管現象により、試験片に沿って、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する第二の領域に運び、この領域で、未反応の標識化結合相手が、流体試料中の被検物質の濃度に対して逆比例の関係で、固定化被検物質と結合するようにすることにより、試験片を展開処理する工程、

c) 検出可能な標識からの信号を計測することができる検出器を有する計器上で、展開処理した試験片を読み取って、第二の領域における標識化結合相手の濃度を測定する工程、

d) 工程c) で計測した検出可能な標識からの信号を、既知の濃度の被検物質を含有する流体試料を使用して同様な方法で実施した信号の測定値と比較することにより、流体試料における被検物質の濃度を測定する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項3】 試験片に第三の領域があり、この領域が、被検物質と標識化結合相手とで形成された結合体を固定化し、この第三の領域で固定化された検出可能な標識からの信号を計測するための手段を含み、第二の領域で固定化された標識化結合相手からの信号と、第三の領域における固定化結合体からの信号との比率を決定する、請求項2記載の方法。

【請求項4】 計器上に正しく配置されていないおそれのある領域について正確な定量操作を行うために、計器が、試験片または検出器を互いに対して動かす手段を含む、請求項2記載の方法。

【請求項5】 2種以上の可動性の標識化結合相手が試験片上の同じかまたは異なる領域にあり、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する2以上の領域があり、その結果2種以上の被検物質を1回の試験で測定することができる、請求項2記載の方法。

【請求項6】 計器が反射分光光度計である、請求項2記載の方法。

【請求項7】 マトリックスが、非吸収性の側方流 (non-bibulous lateral flow) が可能である材料または吸収性の材料からなる、請求項2記載の方法。

【請求項8】 被検物質がヒト血清アルブミンである、請求項2記載の方法。

【請求項9】 検出可能な標識が有色化学種である、請求項2記載の方法。

【請求項10】 有色化学種が金ゾルである、請求項9記載の方法。

【請求項11】 標識化結合相手が抗体である、請求項2記載の方法。

【請求項12】 流体試料中の1種以上の被検物質の濃度を定量的に測定する方法において、

a) そこを通して流体試料が毛管現象によって流れることができるマトリックスを含む試験片であって、検出可能な標識を担持し、被検物質と反応して被検物質-標識化結合相手結合体を形成することができる、被検物質に対する可動性の特異的結合相手を含有する第一の領域と、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する少なくとも1の第二の領域と、被検物質と標識化結合相手とで形成された結合体を固定化するための手段を含む少なくとも1の第三の領域とを有する試験片を用意する工程、

b) 被検物質を含有する疑いのある流体試料を試験片につけ、被検物質を可動性の特異的結合相手と接触させ、それにより、更に反応することが自由である過剰の未反応の標識化結合相手を残しながら、流体試料中に存在する被検物質が標識化特異的結合相手と結合して結合体を形成するようにし、それにより、流体試料が、被検物質-標識化結合相手結合体および未反応の標識化結合相手を、毛管現象により、試験片に沿って、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する第二の領域に運び、この領域で、未反応の標識化結合相手が、流体試料中の被検物質の濃度に対して逆比例の関係で、固定化被検物質と結合し、被検物質-標識化結合相手結合体が、毛管現象によって第三の領域に運ばれ、この領域で固定化手段によって捕捉されるようにすることにより、試験片を展開処理する工程、

c) 検出可能な標識からの信号を計測することができる

検出器を有する計器上で、展開処理した試験片の第二の区域を読み取って、第二の区域における標識化結合相手の濃度を測定し、同様な方法で、展開処理した試験片の第三の区域を読み取って、試験片の第三の区域における標識化結合相手からの信号を測定する工程、

d) 第二の領域で固定化された標識化結合相手からの信号と、第三の領域における標識化結合相手からの信号との比率を決定する工程、

e) 工程d) で決定した信号どうしの比率を、既知の濃度の被検物質を含有する流体試料について同様な方法で計測した信号どうしの比率の計測と比較することにより、流体試料における被検物質の濃度を測定する工程、を含むことを特徴とする方法。

【請求項13】 計器が反射分光光度計である、請求項12記載の方法。

【請求項14】 マトリックスが、非吸収性の側方流が可能である材料または吸収性の材料からなる、請求項12記載の方法。

【請求項15】 被検物質がヒト血清アルブミンである、請求項12記載の方法。

【請求項16】 検出可能な標識が金ゾルである、請求項12記載の方法。

【請求項17】 標識化結合相手が抗体である、請求項12記載の方法。

【発明の詳細な説明】

【0001】

【従来の技術】免疫クロマトグラフィー用の試験片を用いる方式（フォーマット）は、目視的な検出様式を用いる定性的および半定量的検定にとってますます一般的になっている。このタイプの免疫検定は、検出すべき被検物質を含有する疑いのある液体試料を免疫クロマトグラフィー用試験片のアプリケーション区域（試料をつける区域）につけることを含む。試験片はマトリックス材料からなり、この材料の中を、試験流体およびその中に懸濁または溶解した被検物質が、毛管現象により、アプリケーション区域から検出区域まで流れることができ、この検出区域において、可視信号またはそのような信号の不在が被検物質の存在を表すものである。通常、試験片は、検出すべき被検物質を、検出可能な標識を有するその特異的な結合相手と免疫特異的に結合させるための手段を含む。そのようなある様式においては、例えば米国特許第4,446,232号明細書に開示されているように、試験片は、試料アプリケーション区域の下流側の区域に、被検物質に対する可動性の酵素標識化結合相手を含む。被検物質が試料中に存在するならば、被検物質は、その標識化結合相手と結合して結合体を形成する。この結合体は試験片に沿って流動し、酵素標識の存在下において発色応答を行うことができる酵素標識のための基質を含む検出区域に達する。この試験片は、被検物質が固定化されている区域を含み、そのため、試料中の被

検物質の不在によって被検物質と結合しない標識化結合相手が捕らえられ、それにより、検出区域に達することを妨げられるようになっている。この技術の様々な変形が公表され、それらのすべてが、試料中の被検物質の存在または不在が、検出区域における標識化結合相手の検出またはその欠如によって決定されるところの、何らかの競争的特異的結合系を含む。米国特許第4,868,108号明細書には、酵素標識化結合相手に対する固定化捕捉試薬を検出区域に添加して酵素標識を濃縮し、酵素基質と反応するその能力を高め、それにより、検定の感度をさらに高めることを含む同様な様式が開示されている。

【0002】免疫クロマトグラフィーの様式のすべてが、被検物質の検出の信号を発するものとして、酵素標識化結合相手-酵素基質に依存するわけではない。米国特許第4,806,311号明細書には、被検物質と、そのための固定化結合相手との特異的結合検定のための、試薬区域から検出区域に移動する標識化試薬を受け入れるための検出区域を備えた多区域試験具が開示されている。検出区域は、標識された試薬のための、固定化された形態の結合基質を含有する。標識化試薬は、検出可能な物理的性質を有する検出可能な化学群を有し、その物理的性質をそれ自体の物理的性質に基づいて検出することができ、別の基質との化学反応を必要としないようにしている。このような群の例には、着色種発光体、リン光分子、放射性同位体および電気活性成分がある。

【0003】米国特許第4,313,734号明細書は、化学的変化なしに検出することができる、抗体の標識としての金ゾルの使用を記載している。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】免疫クロマトグラフィー用試験片フォーマットは、様々な被検物質の検定に活かすことができる系（抗原か抗体かを問わず）を提供するが、被検物質によっては、定量的な解答が求められる場合に、よくても半定量的である結果しか出せないという限界を被る。したがって、免疫クロマトグラフィー用試験片フォーマットの使用によって実施される分析の結果を定量するための手段を提供することが望ましく、それが本発明の目的である。

【0005】

【課題を解決するための手段】本発明は、試験流体中の被検物質を検定する方法に対する改良であって、試験流体を免疫クロマトグラフィーマトリックスにつけ、このマトリックスが、試験流体および場合によっては被検物質を毛管現象によってマトリックス中に流し、このマトリックスが、被検物質に対する標識化結合相手を含むことを含む改良を提供する。通常は試験片の形態にあるマトリックスはまた、被検物質の存在または不在が、特異的結合相手によって担持される標識の検出によって

決定されるところの少なくとも1の検出区域を含む。改良はまた、検出区域における標識の濃度を測定することができる検出器を有する計器を使用して、その濃度を測定することを含む。

【0006】本発明の好ましい実施態様においては、検出可能な標識を担持し、被検物質と反応して被検物質-標識化結合相手の結合体を形成することができる、被検物質に対する可動性の特異的結合相手を含有する第一の領域と、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する少なくとも1の第二の領域とを有する片を含む試験片が提供される。本明細書に使用する「類似物」とは、特異的結合相手の活性部位と結合することができる物質をいう。

【0007】上述した試験片は、被検物質を含有する疑いのある試験流体試料を試験片につけ、被検物質を、被検物質に対する可動性の標識化特異的結合相手と接触させ、それにより、流体試料中に存在する被検物質が、標識化特異的結合相手と結合して結合体を形成するようにし；更に反応することが自由である過剰の未反応の標識化結合相手を残しておき、それにより、流体試料が被検物質-標識化結合相手の複合体および未反応の標識化結合相手は、毛管現象により、試験片に沿って、固定化被検物質もしくはその類似物を含有する第二の領域に運ばれ、この領域で、未反応の標識化結合相手が、流体試料中の被検物質の濃度に対して逆比例の関係で、固定化被検物質と結合するようにすることにより、展開処理される。

【0008】展開処理した試験片は、検出可能な標識からの信号を計測して、第二の領域における標識化結合相手からの信号を測定することができる検出器を有する計器で読み取られる。流体試料中の被検物質の濃度は、検出可能な標識からの信号を、既知の濃度の被検物質を含有する流体試料を使用して同様な方法で行われた測定と比較することによって測定される。

【0009】測定の感度は、被検物質と、そのための標識化結合相手とで形成される結合体を固定化するための手段を含む第三の領域を試験片に設けることによって高めることができる。例えば、標識化マウス抗体(IgG)において標識された結合相手を使用するならば、このマウス抗体と被検物質との結合体は、固定化ヤギ抗マウスIgGの区域で捕捉することができる。この第三の領域で固定化された検出可能な標識からの信号を計測し、第二の領域における標識化結合相手の信号と、第三の領域におけるそれとの比率を決定することにより、標識化結合体の不均一な付着および/またはマトリックス中の不均一な流動によって生じる誤差を修正することができる。

【0010】

【発明の実施の形態】本発明は、まず、流体試料が毛管現象によって流れることができる試験マトリックスを用

意することによって実施される。通常、マトリックスは、試験流体が水平方向に流れる試験片の形態にあるが、試験流体が上から下またはその反対に垂直方向に流れることができる層に構成することもできる。以下の説明は主に試験片のフォーマットに関する。

【0011】試験片は、試験流体およびその中に含まれる被検物質が毛管現象によって流れることができるものならば、いかなるマトリックス材料から製造することもできる。マトリックスは、非吸収性の側方流を可能にする材料であることもできる。このタイプの流動は、マトリックス材料が成分のうち1種以上を吸着または吸収することができる場合に当てはまるであろう1種以上の成分の選択的な保持とは対照的に、液体の溶解または分散した成分のすべてが実質的に等しい速度および比較的減損のない流れでマトリックス中を運ばれる液体流であるとして、米国特許第4,943,522号明細書に記載されている。このようなマトリックス材料の例は、Porex Technologies社(Fairburn, GA)の高密度または超高分子量のポリエチレンシート材料である。クロマトグラフィー用試験片を製造するためのマトリックス材料として使用するのに同等に適したものは、紙、ニトロセルロースおよびナイロンのような吸収性材料である。

【0012】様々な免疫クロマトグラフィー用試験片フォーマットが本発明とともに使用するのに適している。特に適したフォーマットは、米国特許第4,446,232号明細書に開示されている、抗原の存在を検定するための試験具であって、固定化被検物質と、検定すべき被検物質に特異的な酵素結合抗体とが設けられた第一の区域を有するマトリックス材料片を含む試験具である。標識化抗体は、第一の区域に導入された被検物質と反応すると、第二の区域に流れることができるが、試験流体中の被検物質が存在しない場合、固定化被検物質との相互作用によって第一の区域に拘束されることにより、そのように流れることはできない。被検物質は通常は抗原であるが、抗体を被検物質としてその存在を検出するようにフォーマットを構成することもできる。このフォーマットに対する変形は米国特許第4,868,108号明細書に開示されている。別の変形においては、酵素基質を、第二の固定化された抗体の領域に配置して、酵素標識化抗体と被検物質とで形成される結合体を捕捉するようにする。この種のフォーマットは、本発明に適合するのに特に適しているが、本発明は、酵素とその基質とが相互作用して検出可能な信号を発することに限定される必要がないため、物理的に検出可能ないかなる信号をも使用することができる。例えば、複合体を、試験片上の、被検物質に対する標識化結合相手が拘束される区域の下流側に位置する別個の検出区域に固定化することにより、検出可能な標識の物理的に検出可能な性質を計測してその濃度を測定することができる二つの領域が設けられる。固定化被検物質を捕捉手段として含む第二の領

域における検出可能な標識の物理的に検出可能な性質からの信号と、標識化結合相手に対する固定化抗体が捕捉手段であるところの第三の区域における標識の物理的に検出可能な性質からの信号とを計測し、これらの信号どうしの比率を決定することにより、被検物質濃度の試験の精度を高めることができる。この技術は、標識化複合体の付着および／またはマトリックス中の不均一な流動における誤差を修正するため、精度が高まる。具体的には、標識化複合体の付着および／またはマトリックス中の不均一な流動における前述の誤差は普通、小さいものではあるが有意であり、結合平衡を実質的に乱さない。したがって、二つの結合区域における信号どうしの比率は、いずれかの区域の信号そのものよりも正確な被検物質濃度の計測値である。

【0013】本発明の好ましい実施態様においては、試験片もしくは検出器を互いに対して動かすための手段、例えば試験片を配置するための、検出器の読取りヘッドの下で横方向に動かすことができる試料テーブルを備えた反射分光光度計が提供される。検出可能な物理的性質が所定の波長での光の反射率である場合、検出器は分光光度計である。この技術は、分光光度計の検出手段に対して正確に配置されていないおそれのある試験片の領域について正確な定量を提供するのに役立つ。具体的には、いかなる所望の領域の反射率をも測定することができるよう、検出器に対する試験片の位置をマイクロプロセッサによって制御することもできる。

【0014】

【実施例】以下の実施例により、本発明を実施する方法をさらに詳細に説明する。

【0015】実施例1

単一ブロッキングバンドフォーマットにおけるHSAの定量

Immunodyne（登録商標）ナイロン膜中に固定化HSAのブロッキングバンドおよび抗HSA：金ゾル複合体の広いバンドを含む免疫クロマトグラフィー用試験片を製造した。この試験片を図1に示す。図中、試験片10は、ブロッキングバンド3と、それよりも前にある抗HSA：金ゾル含有領域5と、試料アプリケーション区域7とを含む。これらの試験片は、次のようにして製造した。

【0016】Immunodyne膜の4.2×12.6cm片をComag 薄膜クロマトグラフィー（TLC）ストリップ装置上に、長い辺をベース部に平行にし、Y軸の0位置から上に1cmずらした状態で配置した。次に、リン酸緩衝溶液（PBS、塩化ナトリウム0.137M、塩化カリウム0.0027M、リン酸カリウム0.010M、pH7.4）中、濃度10mg/mlのヒト血清アルブミン（HSA）溶液を調製した。TLCストリップを次の設定にして、3.5cmのY位置で10mg/mlのHSA溶液の長さ6cmのバンドをストリップした。

（a）プレート＝90、（b）バンド＝60、（c）秒／μl＋6、（d）容量＝6μl

【0017】これにより、長さ6cm、幅約1mmのバンドが得られた。したがって、ストリップ密度は10μl/cm²であり、HSAの密度は100μg/cm²であった。

【0018】3分後、膜をTLCストリップから取り出し、リン酸緩衝溶液（Sigma社、pH7.4）中0.5%カゼイン（Hammerstein from Schlesinger）を含有する平坦なプラスチックトレイに入れ、オービタルシェイカに載せて30分間ゆるやかに振った。

【0019】この時点で、PBS中0.02%アジ化ナトリウム、0.02%Tween 20 および0.1%PEG 20の洗浄緩衝液を調製した。膜をカゼインブロッキング溶液から取り出し、オービタルシェイカに載せてゆるやかに振りながら洗浄緩衝液25mlで30分間2回洗浄したのち、膜を洗浄緩衝液から取り出し、室温で一晩乾燥させた。

【0020】金ゾルは、酸性塩化金一水和物（HCl・Au・H₂O）の10mg/ml溶液2.0mlをクエン酸三ナトリウムの還流中の100℃溶液（0.00155M）に加えることによって調製した。還流を30分間続けたのち、冷却し、0.2μmフィルタに通してろ過した。上述したように調製した金ゾル溶液10mlに対し、ヒト血清アルブミンに対するモノクローナル抗体240μgおよび0.1M炭酸カリウム50μlを加えることによって抗体－金ゾル複合体（Ab：金ゾル）を調製し、この混合物を15分間激しく攪拌したのち、1%（w/v）PEG-200.5mlを加え、続いてさらに10分間激しく攪拌した。この時点で、水中10%ウシ血清アルブミン（BSA）1.0mlを加え、混合物を10分間激しく攪拌した。14,500Gで30分間20℃で遠心分離することによってAb：金ゾルを単離し、それを洗浄緩衝液（1%BSA、0.05%PEG-20、2mMホウ酸ナトリウム、pH9.0）中に懸濁することによって10回洗浄し、上述したような遠心分離によって単離した。最終的な遠心分離ののち、Ab：金ゾルを洗浄緩衝液1.0mlに懸濁し、4℃で貯蔵した。

【0021】上述した乾燥膜を、前記と同様にY方向に1cmずらした状態で再びTLCストリップに載せた。Ab：金ゾル40μlと、4%カゼイン20μlと、1%メチルセルロース（Methocel）（K4M）＋0.6%ポリビニルアルコール（PVA）20μlとの混合物を調製し、前記と同様に、2.3cmと2.9cmとのY位置の間で7本の隣接するバンドをストリップした。試験片を室温で乾燥させ、使用する前に0.5cm幅の細片に引き裂いた。

【0022】尿の中間比重（SG＋1.017）プールを、30,000ダルトンよりも大きいタンパク質を通さない限外ろ過膜に通してろ過した。ろ液を使用し、様々な既知の濃度のHSA溶液をスパイクする（加える）

ことにより、様々な既知の濃度のHSA溶液を調製した。

【0023】試験片を、HSAをスパイクした尿ろ液中に約0.5cmの深さで垂直に釣り下げ（試験片の、A b：金ゾル複合体バンドを含有する側の端部で）、5～10分間かけて液体を試験片の最上部に到達させることにより、試験片を展開処理した。これらの試験片を室温で空気乾燥させ、プラスチックトリサイト（trycite）取っ手材料に取り付け、分析した。

【0024】0、1、2、3および5mg/dlのHSAを含有する中間比重尿の限外ろ液の試料を用いて試験片を展開処理した。CT100 反射分光光度計で557nmでの反射率を計測することにより、各試料濃度での試験片を読み取り、そのとき、計測の合間に試験片の端から1mmを切除することにより、試験片の走査をまねた。

【0025】詳細には、試験片を試料流体で展開処理し、室温で空気乾燥させたのち、両面接着剤を用いて試験片をプラスチックの取っ手材料に取り付けた。プラスチック/膜の積層体を、結合したA b：金ゾルのおかげで見ることができるHSAバンド3（図1）から7mmのところまで（試料塗布端に向かって）切り詰めた。次に、試験片を、CT100 反射分光光度計の読取りテーブルの上に、末端のストッパに押し付けた状態で載せた。この位置では、10番目のパッド位置の読取り区域は試験片の端から2.5mmのところであった。次に、10番目のパッド位置の反射率を計測し、その後、試験片の端から1mmを切除し、試験片を読取りテーブルの端に押し付けた。再度、10番目のパッド位置を読み取り、プラスチックおよび膜の積層体の端がHSAバンドを3mm過ぎる地点に一致するまでこの処理を繰り返した。この作業を
30 実行するソフトウェアが利用できなかったため、このような技法を用いて、読取りヘッド（検出器）を読取り区域（HSAバンド）に対して動かした。適当なソフトウェアを具備しているならば、プラスチックおよび膜の積層体を載せた読取りテーブルを読取りヘッドにかけて動かすことにより、試験片を走査して反射率を測定することができる。

【0026】この実験の結果を図2のグラフに示す。

【0027】図2から、様々な濃度のHSAを含有する尿試料によって展開処理した免疫クロマトグラフィー用試験片の反射率走査の谷の深さがHSA濃度に正比例すると断定することができ、また、HSAに対する用量反応を反射率に見てとることができる。金ゾルバンドは全読取り区域をカバーするわけではないが、バンドが読取り区域にあるとき、反射率は10～15%低下する。高反射率（白色区域）の多くが金ゾルバンドとともに計測されるが、反射率におけるこの10～15%の変化が検出される。

【0028】狭いスリットをもつマスクを読取りヘッド区域に加えるならば、高反射率の白色区域が金ゾルバン
50

ドと同時に読取り区域に入らないため、反射率の範囲は大幅に増大するであろう。この増大した反射率が被検物質（HSA）濃度のより詳細な識別を可能にするであろう。ステップモータを用いると、ステップモータは一度に1回転の何分の1かの範囲で動かすことができるため、連続的な読取りを行いながら、分光光度計の試験片テーブルを試験片上のいかなる区域の中にもゆっくりと動かして、谷の反射率または谷の中の区域を見いだすための良好な解像度を得ることができる。

【0029】実施例2

ブロッキングバンドおよび捕捉区域を含むフォーマットにおけるHSAの定量実施例1の方法および図3のフォーマットにしたがって免疫クロマトグラフィー試験片を調製した。図3を参照すると、試験片10は、固定化HSAのブロッキングバンド3と、マウス抗HSA：金ゾル複合体区域5と、固定化ヤギ抗マウスIgG抗体の捕捉バンド9とを有している。このバンドを調製する際、0.135M 塩化ナトリウム中5mg/mlの濃度のヤギ抗マウスIgG（sigma 8770）の溶液を調製した。これを、上述したように、4.0cmのY距離でストリップした。ストリップ密度はIgGが50μg/cm²であった。試料アプリケーション区域7を、HSAを含有する試料中に、複合体区域5を浸漬するのに必要な深さよりも浅く浸漬すると、流体が毛管作用によって試料から上に流れた。試料中のHSAは複合体区域で金ゾル：抗HSAと複合し、試料中のHSAに対して過剰モルの複合体があり結合すべきHSAを見いださないため遊離状態にある複合体とともに、試験片を上動く。遊離状態の複合体はブロッキングバンド3で固定化HSAと結合し、その間、金ゾル抗HSA：HSA結合体は試験片を上流れ続け、捕捉バンド9で、固定化ヤギ抗マウスIgG抗体によって拘束される。

【0030】0、0.5、0.8、1.0、1.5および2.0mg/dlの濃度のHSAを含有する中間SG尿限外ろ液の試料を用いてこのフォーマットの試験片を展開処理した。各HSA濃度について2つの試験片を使用した。バンドを10番目のパッド位置の中心に目視で合わせる方法を使用して、557nmでの反射率データをCT100上で収集した。10番目のパッドの位置は、Multistix（登録商標）10 SG尿試験片製品の端に隣接する5mmの部分
40 部分を占める。Multistix 10 SG製品は、長さ約10.9cm、幅約5mm、厚さ約0.5mmのプラスチック片であり、そこに、乾燥試薬を含むそれぞれ5mm×5mmの10個の紙パッドが取り付けられている。10番目のパッドがプラスチックの一端と平坦に並び、パッド間の間隔は2.5mmであり、パッドを持たない、取っ手区域として作用する他端に3.4cmのプラスチック片を残している。図4には、この実験の結果を反射率としてグラフにしたものを示す。反射率が固定化HSAバンド3（図3）から得られたものであるこの図では、HSAに対す

る用量応答は、離れたところにある二つの値を除き、反射率 (R) に関して直線的である。図5に示す、HSA に対するヤギ抗マウス IgG バンド9の反応はさらに分散しており、反射率低下の大部分が0~0.5mg/dl の HSA の範囲で起こっている。しかし、HSA バンドの反射率値はヤギ抗マウス IgG バンドの反射率 (R) の値に比例するため、HSA の濃度をHSA バンドの反射率とヤギ抗マウス IgG バンドの反射率との比率に対してグラフにした図6から見てとれるように、変動性は低下する。HSA 濃度に対して曲線的ではあるが滑らかな用量応答が図6に見られる。この比率を逆にすることもでき、その場合、比率そのものと同じ効果を有するであろう各比率の逆数を取ることに等しくなる。したがって、これら二つの反射率値どうしの比率の測定が試薬調製の間の複合体付着の変動性ならびに試料による試験片の展開処理中の流動における不均一性を修正する。すなわち、ある試験片における金ゾル：抗HSAが別の試験片におけるよりも少ないならば、二つのバンドの比率は、調製における不均一性を修正した結果を提供する。試験片の展開処理中の流動における不均一性も同様な方法で修正することができる。

【0031】実施例3

2ブロッキングバンドフォーマットにおけるHSAおよびIgGの定量

ヒト血清アルブミン (HSA) およびヒト (H) IgG の両方を計測するように免疫クロマトグラフィー用試験片を構成して、これらの被検物質それぞれを別個に定量した。Immunodyneナイロンから、図7の様式にしたがって、試料アプリケーション区域7と、その後の、金ゾル標識抗HSAおよび金ゾル標識抗 (H) IgG 複合体を含む区域5とを含む試験片を調製した。この試験片は二つのブロッキングバンド、すなわち、固定化HSAを含む第一のブロッキングバンド3と、固定化 (H) IgG を含む第二のブロッキングバンド4とを含むものであった。

【0032】0、5、10、15、20、30および40mg/lのHSAを含有する中間SG尿の限外ろ液の試料を、0mg/lまたは100mg/lの (H) IgG とともに用いて、試験片を展開処理した。CT100 反射分光光度計上で557nmでの反射率を計測し、試験片を物理的に切除し、Multistix SG試験片の10番目のパッド位置に合わせて反射率読取り値を得ることにより、各HSA濃度について二つの試験片を試験した。図8は、IgG を含まない試料を用いた場合の、HSAおよび (H) IgG の両ブロッキングバンドを含む試料の反射率を表すグラフである。図9は、100mg/l (H) IgG を種々の濃度のHSAとともに含有する試料についての同様なデータを示す。図8のデータから、HSAブロッキングバンドの反射率が試料中のHSA濃度に正比例し、(H) IgG ブロッキングバンドの反射率が、試料中の (H) IgG

Gの不在においてそれと結合する金ゾル：抗 (H) IgG により、約0.88 (1.0の最大全反射率に基づく) であると判断することができる。図9のデータは、図8のデータと同様に、HSA濃度に対する反射率の同様な正比例を示すが、(H) IgG バンドの反射率は、試料中に100mg/l含まれる (H) IgG のため、さらに高い (0.91~0.92)。(H) IgG は、金ゾル抗 (H) IgG 複合体に結合し、それが (H) IgG ブロッキングバンド中の固定化 (H) IgG に結合することを許さない。これは、(H) IgG の存在または不在にかかわらずHSAに対する用量応答が同じであり、

(H) IgG に対する別の用量応答があることを実証する。したがって、二つの異なる被検物質に対し混合金ゾル抗体結合体を有し、別々の領域にそれらの被検物質もしくはそれらの類似物の固定化バンドを有する試験片を使用することにより、各被検物質に対する計量的に検出可能な別々の用量応答を得ることができる。1枚の免疫クロマトグラフィー試験片を用いて2種以上の被検物質を定量することを可能にするため、これは重要である。

【図面の簡単な説明】

【図1】単一のブロッキングバンドを有する、本発明に係る免疫クロマトグラフィー用試験片の平面図を示す。

【図2】図1の試験片を用いて液体試料中のHSAを測定したときの、HSAバンドの前端からの距離と反射率との関係を示す図である。

【図3】単一のブロッキングバンドと単一の捕捉バンドを有する、本発明に係る免疫クロマトグラフィー用試験片の平面図を示す。

【図4】図3の試験片を用いて液体試料中のHSAを測定したときの、ブロッキングバンドから得られた反射率とHSA濃度との関係を示す図である。

【図5】図3の試験片を用いて液体試料中のHSAを測定したときの、捕捉バンドから得られた反射率とHSA濃度との関係を示す図である。

【図6】図3の試験片を用いて液体試料中のHSAを測定したときの、ブロッキングバンドから得られた反射率と捕捉バンドから得られた反射率との比と、HSA濃度との関係を示した図である。

【図7】2のブロッキングバンドを有する、本発明に係る免疫クロマトグラフィー用試験片の平面図を示す。

【図8】図7の試験片を用いて液体試料中 (ヒトIgG は含まれていない) のHSAを測定したときの、HSAの濃度と反射率を示す図である。

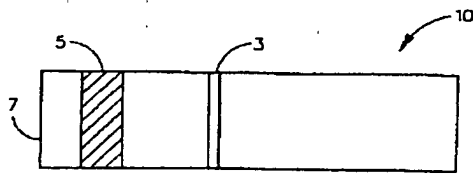
【図9】図7の試験片を用いて液体試料中 (ヒトIgG を100mg/l含む) のHSAを測定したときの、HSAの濃度と反射率を示す図である。

【符号の説明】

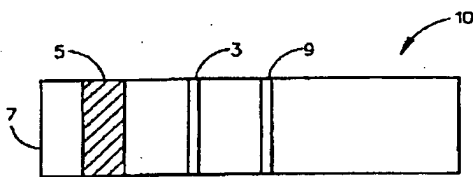
- 3、4 ブロッキングバンド
- 5 複合体区域
- 7 試料アプリケーション区域

10 免疫クロマトグラフィー用試験片

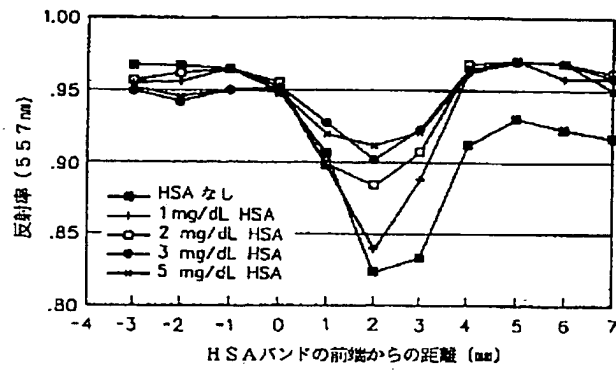
【図1】



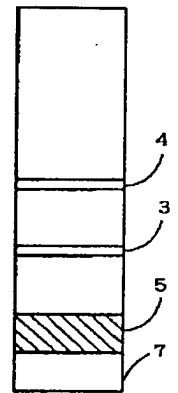
【図3】



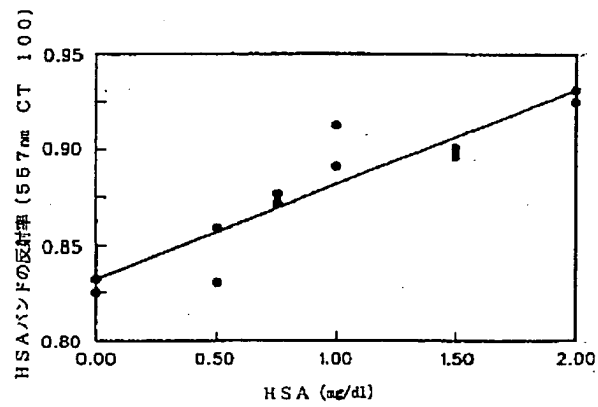
【図2】



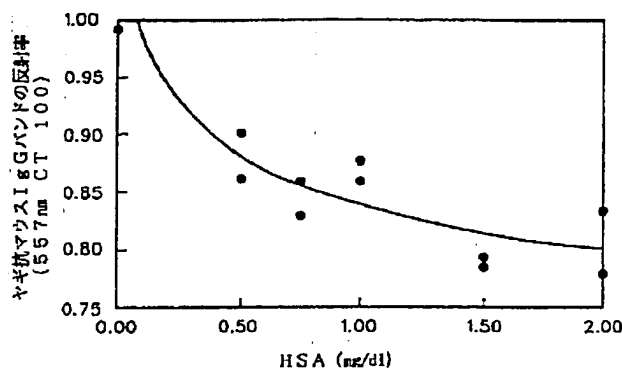
【図7】



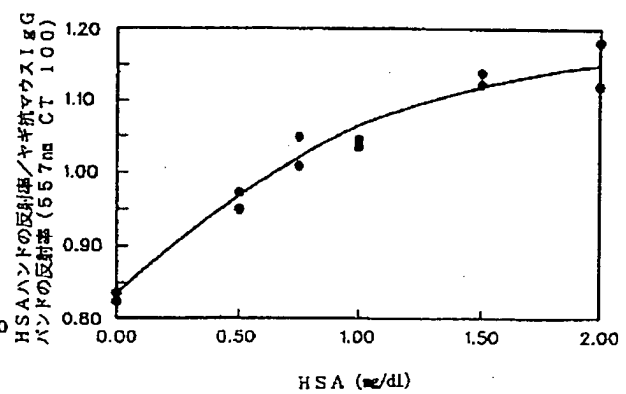
【図4】



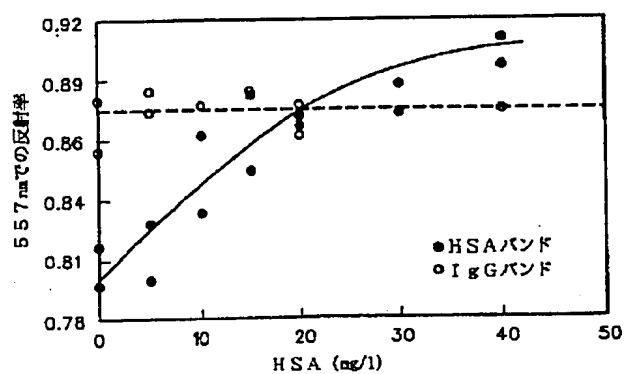
【図5】



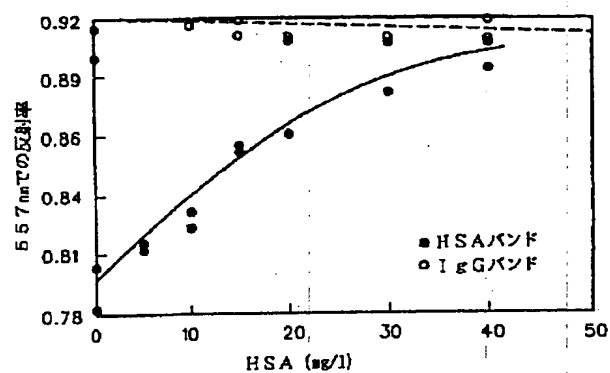
【図6】



【図8】



【図9】



THIS PAGE BLANK (USPTO)